

PCT

WELTOGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>A61K 31/70</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 96/23506</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>8. August 1996 (08.08.96)</b>
 (21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE96/00169</b>			
 (22) Internationales Anmeldedatum: <b>31. Januar 1996 (31.01.96)</b>			
 (30) Prioritätsdaten: 195 03 152.0 1. Februar 1995 (01.02.95) DE 195 45 892.3 8. December 1995 (08.12.95) DE			
 (71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).			
 (72) Erfinder; und			
 (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): FAHRIG, Rudolf [DE/DE]; Fritz-Goy-Weg 3, D-30657 Hannover (DE). STEINKAMP- ZUCHT, Angela [DE/DE]; Roonstrasse 3, D-30161 Han- nover (DE).			
 (74) Anwalt: BUTENSCHÖN, BERGMANN, NÖTH, REIT- ZLE, GRAMBOW, KRAUS; Mozartstrasse 17, D-80336 München (DE).			

(54) Title: USE OF 5'SUBSTITUTED NUCLEOSIDES TO PROVIDE RESISTANCE IN CYTOSTATIC TREATMENT AND MEDICA-  
MENTS CONTAINING SAID NUCLEOSIDES

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON 5' SUBSTITUIERTEN NUKLEOSIDEN ZUR HEMMUNG VON RESISTENZBILDUNG  
BEI DER ZYTOSTATIKABEHANDLUNG UND ARZNEIMITTEL, ENTHALTEND DIESSE NUKLEOSIDE

(57) Abstract

The invention relates to the use of 5'-substituted nucleosides in combination with at least one cytostatic in the production of a medicament to prevent or reduce the build-up of resistance in cytostatic treatment and a medicament containing BVDU and/or its metabolites.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von 5'-substituierten Nukleosiden in Kombination mit mindestens einem Zytostatikum zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung bzw. Reduktion der Resistenzbildung bei der Zytostatikabehandlung sowie ein Arzneimittel, enthaltend BVDU und/oder seine Metaboliten.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Uzbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

VERWENDUNG VON 5' SUBSTITUIERTEN NUKLEOSIDEN ZUR HEMMUNG VON RESISTENZBILDUNG BEI DER ZYTOSTATIKABEHANDLUNG UND ARZNEIMITTEL, ENTHALTEND DIESE NUKLEOSIDE

5

Das Auftreten von "Arzneimittel-Resistenz" ist der Hauptgrund für Fehlschläge in der Krebs-Chemotherapie. Tumoren, welche anfangs empfindlich auf Zytostatika reagieren, erholen sich sehr häufig nach einer gewissen Behandlungszeit und sind dann resistent gegenüber der Wirkung verschiedenartiger antineoplastischer Arzneimittel. Obwohl das Problem der "Arzneimittel-Resistenz" schon seit 1948, dem Beginn der Krebstherapie mit Zytostatika, bekannt ist, wurde bis heute kein Weg gefunden, die Resistenzbildung zu verhindern. Charakteristisch für alle bisher untersuchten hochresistenten Tumoren und Zelllinien ist die Amplifikation (Vervielfachung) einer kleinen Gruppe von Genen. Als Folge dieser DNA- oder Genamplifikation kann eine erhöhte Expression dieser Gene nach-

gewiesen werden, welche zur Resistenz gegenüber dem Arzneimittel führt. Als Folge dieser DNA-Amplifikation kann eine erhöhte Expression verschiedener Gene nachgewiesen werden. Schutzproteine, die zur Ausschleusung von Giftstoffen aus der Zelle dienen, können so vermehrt gebildet werden (P-Glycoprotein). Dieser Effekt wird auch als "multi-drug-resistance" (MDR) bezeichnet.

10 Zusätzlich zur MDR korreliert der Amplifikationsgrad gewisser Gene, vor allem gewisser Onkogene, mit dem Grad der Malignität. So sind die Überlebenschancen bei einer Amplifikation von ERVV2, RASKI, INT3, HST1, MYC und KSRAM beim Magenkrebs (Hirohasi, S., and Sugimura, T. Genetic alterations in human gastric cancer. *Cancer cells* (Cold Spring Habor), 3:49-52, 1991) und ERBB2 und MYC beim Ovarkarzinom (Sasano, H., Garrett, C.T., Wilkinson, D.S., Silverberg, S., Comerford, J., and Hyde, J. Protooncogene amplification and tumor ploidy in human ovarian neoplasm. *Hum. Pathol.*, 21:382-391, 1990) sehr schlecht. Beim Brustkrebs korreliert die Amplifikation von MYC (Borg, A., Baldetorp, B., Fernö, M., Olsson, H., and Sigurdsson, H. C-myc amplification is an independent prognostic factor in postmenopausal breast cancer. *Int. J. Cancer*, 51:687-691, 1992) und Co-Amplifikation von INT2 und HST1 (Borg, A., Sigurdsson, H., Clark, G..M., et al., Association of INT2/HST1 coamplification in primary breast cancer with hormone-dependent phenotype and poor prognosis. *Br.J.Cancer*, 63:136-142, 1991) mit dem Krankheitsverlauf. Die Amplifikation von ERBB2 (Descotes, F., Pavy, J.-J., and Adessi, G.L. Human breast cancer: Correlation study between HER-2/neu amplification and prognostic factors in an unselected population. *Anticancer Res.*,

13:119-124, 1993) und EGFR (Klijn, J.G.M., Berns, P.M.J.J., Schmitz, P.I.M., and Foekens, J.A. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr. Rev.*, 13:3-17, 1992) ist mit einem schlechten Krankheitsverlauf verbunden. Beim Ösophaguskarzinom korreliert die Co-Amplifikation von HST1 und INT2 mit dem Grad der Metastasierung (Tsuda, T., Tahara, E., Kajiyama, G., Sakamoto, H., Terada, M., and Sugimura, T. High incidence of coamplification of hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 49:5505-5508, 1989).

15 Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß durch chronische Behandlung mit kanzerogenen Zytostatika induzierte Genamplifikation nicht nur zur Resistenz gegenüber dieser Behandlung führt, sondern auch zur Überexpression gewisser Onkogene, welche den Grad der Malignität kontrollieren.

20 Es sind eine Reihe von Substanzen beschrieben worden, die der erworbenen Arzneimittelresistenz entgegenwirken. Hierzu gehören die von Kennedy (Kennedy, A.R., Prevention of Carcinogenesis by Protease Inhibitors, *Cancer Res.*, 54:1999-2005, 1994) beschriebenen Arbeiten über die anti-kanzerogenen Wirkungen von Protease-Inhibitoren. Diese können kanzerogeninduzierte Genamplifikation auf nahezu normale Level herunterdrücken. Kennedy beobachtete, daß strahleninduzierte Genamplifikation in gleicher Weise unterdrückt wird, wie es ihrer Fähigkeit entspricht, strahleninduzierte Transformation zu unterdrücken, so daß auf einen Zusammenhang zwischen beiden Prozessen geschlossen wird. Darüber hinaus wirken Protease-Inhibitoren als 25 Antagonisten von (co-rekombinogenen) Tumor-Promotoren 30 35

bei Auslösung von Transformation in vitro. Protease-Inhibitoren werden auch als wirkungsvolle Anti-Promotoren in In-vivo-Untersuchungen beschrieben (Troll, W., Klassen, A., and Janoff, A. Tumorigenesis in mouse skin: inhibition by synthetic inhibitors of proteases. *Science (Washington DC)* 169:1211-1213, 1970).

Aus der Literaturstelle Moscow, I.A., and Cowan, K.H. Multidrug resistance. *J.Natl.Cancer Inst.* 80: 14-20, 1988, ist bekannt, daß Verapamil der MDR entgegenwirkt. Dieser "calcium channel blocker" erhöht die Zytotoxizität durch Erhöhung der intrazellulären Akkumulation von Arzneimitteln. Wahrscheinlich geschieht dies durch eine Wirkung auf das P-Glykoprotein oder andere Transportproteine. Die Toxizität dieser und ähnlicher Substanzen, wie z.B. Quinidin, steht ihrem klinischen Einsatz im Wege.

Ausgehend hiervon, ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine wirksame Substanz zur Verhinderung bzw. Reduzierung der Resistenzbildung gegenüber der Zytostatikabehandlung anzugeben und ein entsprechendes Arzneimittel vorzuschlagen.

Die Aufgabe in bezug auf die Substanz wird durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruches 1 gelöst, in bezug auf das Arzneimittel durch die Merkmale des Anspruches 9.

Erfindungsgemäß wird somit vorgeschlagen, die Resistenzbildung durch gleichzeitige Gabe von 5' substituierten Nukleosiden und einem Zytostatikum zu verhindern bzw. zu reduzieren. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß 5' Nukleoside die Entstehung

von kanzerogeninduzierten Genamplifikationen verhindert oder zumindest abschwächt. Dadurch wird die Möglichkeit eröffnet, durch gleichzeitige Gabe dieser Nukleoside mit einem Zytostatikum die Entstehung von Resistenzen gegenüber diesem Arzneimittel zu verhindern und auch den Grad der Malignität zu beeinflussen.

Als Beispiel für 5'Nukleoside sind zu nennen: 5-(2-bromovinyl-2'-deoxyuridin (BVDU), (E)-5-(2-bromovinyl)-1-β-D-arabinofuranosyluracil, (E)-5-(2-bromovinyl-2'-deoxy-4'-thiouridin. Abb. 2: 5-Jodo-2'-dexycytidin, 5-Jodo-2'-deoxyuridin, 2'-Deoxy-5-trifluoromethyluridin, besonders bevorzugt ist BVDU und (E)-5-(2-Bromovinyl-)uracyl (BVU).

Die Erfindung betrifft weiterhin Arzneimittel zur Verhinderung der Resistenzbildung gegenüber Zytostatikabehandlung, die 5' Nukleoside enthalten. Die 5' Nukleoside sind dabei in der Formulierung des Arzneimittels in einer Menge enthalten, aus der eine Konzentration von 0,02 µg/ml bis 10 µg/ml im Blut resultiert. In Versuchen konnte gezeigt werden, daß der optimale Bereich bei 0,05 µg/ml bis 5 µg/ml liegt.

Die Zytostatika können dabei in den üblichen bisher bekannten Mengen in der Formulierung enthalten sein (Oshiro, Y., Piper, C.E., Balwierz, P.S., and Garriot, M.L. (1992) Genotoxic properties of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU). Fundamental and Applied Toxicology, 18, 491-498). Beispiele für Zytostatika sind Cyclophosphamid und andere Alkylaten, Antimetabolite wie Methotrexat, Alkaloide wie Vinblastin, Antibiotika wie Bleomycin, Cisplatin so-

wie andere Stoffe. Weitere Beispiele für Zytostatika sind aus "Rote Liste 1995", Editio Cantor Verlag für Medizin und Naturwissenschaften, Aulendorf/Württ., 1995, zu entnehmen.

5

Die Träger-, Zusatz- und Hilfsstoffe entsprechen denen, wie sie bisher aus dem Stand der Technik bekannt sind. Das Arzneimittel selbst kann dabei in fester oder flüssiger Form oder auch als Spray vorliegen.

10

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Modellversuchen näher erläutert.

#### A. Modellsubstanzen

15

Für die Untersuchung von Amplifikationsphänomenen dient eine Hamsterzelllinie, die ein Virus (Simian Virus 40) im Genom integriert enthält. Bekannt ist für diese Zelllinie, daß eine Zugabe genotoxischer Substanzen, aber auch verschiedener "nichtgenotoxischer" Kanzerogene und Tumor-Promotoren zur Amplifikation von SV40-DNA im Hamstergenom führt. Die Methode beruht darauf, daß als Sonde dienende markierte SV40-DNA mit Hamsterzell-DNA, die SV40-DNA in amplifizierter Kopienzahl enthält, hybridisiert wird. Die Menge gebundener Sonde gibt Aufschluß über den Amplifikationsgrad der integrierten Virus-DNA.

20

25

30

Zur Bestimmung des Amplifikationsgrades wird gleichzeitig mit der SV40-DNA die Albumin-Gen-DNA gemessen. Das Albumin-Gen wird nämlich im Gegensatz zur SV40-DNA in der Zelle nicht amplifiziert. Der Wert des relativen SV40-DNA-Gehalts ergibt sich demnach aus

dem Quotienten des Signals der mit SV40-DNA hybridisierten DNA-Sonde zu dem Signal der mit Albumin-Gen hybridisierten DNA-Sonde aus denselben SV40-transformierten embryonalen CO631-Hamsterzellen.

5

Als Modellsubstanzen dienten:

1. Mutagene und rekombinogene genotoxische Kanzerogene (Positiv-Kontrolle)

10

Triethylenmelamin (TEM)

4-Nitrochinolin 1-Oxid (4-NQO)

2. Nicht-Kanzerogene (Negativ-Kontrolle), welche weder Mutationen noch Rekombinationen induzieren

15

Aceton

Dimethylformamid

3. Co-rekombinogene Tumor-Promotoren

Mezerein

20

12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA)

Chrysarobin

Coumarin

4. Rekombinogene nicht-genotoxische Kanzerogene mit unbekanntem Wirkmechanismus

25

Thioacetamid

Acetamid

5. Testosteron nach Metabolisierung durch Rattenlebermikrosomen (S9-Mix) sowie ohne S9-Mix

30

Testosteron wirkt

mit S9-Mix anti-rekombinogen und  
ohne S9-Mix co-rekombinogen

Die Wirkung der obengenannten Modellsubstanzen allein oder in Kombination mit einem Kanzerogen wurde im Genamplifikations-System untersucht.

5 Die Ergebnisse mit den Modellsubstanzen sind in den Figuren 1 bis 3 zusammengefaßt.

Die Nicht-Kanzerogene Aceton und Dimethylformamid zeigen keine Wirkung.

10 Alle anderen Substanzen, die nicht-genotoxischen Kanzerogene mit unbekanntem Wirkmechanismus, Thioacetamid und Acetamid, die genotoxischen Kanzerogene TEM und 4-NQO sowie die Tumor-Promotoren Mezerein, 15 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA), Chrysarobin und Coumarin, für sich allein gegeben, erhöhen die SV40-Genamplifikation.

20 Teststeron erniedrigt mit S9-Mix die amplifizierende Wirkung von Methotrexate (MTX), ohne S9-Mix erhöht es die amplifizierende Wirkung von Amino-6-mercaptopurin (AMP).

25 Diese Ergebnisse zeigen eine Übereinstimmung zwischen der Auslösung von Rekombination und SV40-Genamplifikation.

30 B. Hemmung kanzerogeninduzierter Genamplifikation durch (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU)

Die Ergebnisse sind in den Figuren 4 bis 7 zusammengefaßt.

5 BVDU hatte im Versuch mit Hefen (Figur 4) eine anti-rekombinogene und co-mutagene Wirkung gezeigt. Diese Wirkung war in Gegenwart von Lebermikrosomen (S9-Mix) in niedrigeren Konzentrationen sichtbarer als in Abwesenheit von S9-Mix und auch sehr viel ausgeprägter. Eine Metabolisierung von BVDU verstärkt also den antirekombinogenen Effekt.

10 10 BVDU zeigt in klinisch relevanten Dosen eine Hemmung AMP-induzierter Genamplifikation. Der Effekt setzt bei etwa 0,05 µg/ml ein und führt dosisabhängig bei 5 µg/ml zu einer vollständigen Hemmung der AMP-induzierten Genamplifikation (Figur 5).

15 15 Der unabhängige Wiederholungsversuch bestätigt das Ergebnis (Figur 6). Darüber hinaus scheint BVDU allein den spontanen Amplifikationsgrad leicht zu erniedrigen.

20 20 Zugabe von S9-Mix zeigt ebenfalls eine Erniedrigung AMP-induzierter Genamplifikation. Dieser erfolgt allerdings in einem niedrigeren Dosisbereich als in den Versuchen ohne S9-Mix. Eine mögliche Metabolisierung von BVDU scheint den amplifikationshemmenden Effekt also noch zu verstärken (Figur 7). Dies würde die Relevanz der Ergebnisse noch verstärken.

25 30 Zusammenfassend kann gesagt werden, daß BVDU kanzerogeninduzierte Genamplifikation hemmt. Dies eröffnet die Möglichkeit, durch gleichzeitige Gabe von BVDU mit einem Zytostatikum die Entstehung von Resistzenzen gegenüber diesem Arzneimittel zu verhindern und die Malignität zu erniedrigen.

C. Verhinderung der Bildung von "Multi-Drug-Resistance" (MDR) in menschlichen und tierischen Tumorzellen gegenüber Zytostatikabehandlung durch gleichzeitige Gabe von BVDU

5

Die menschliche Tumorzelllinie K562-WT (Fig. 8) und die Tumorzelllinie F46-WT der Maus (Fig. 9) (WT = Wildtyp = empfindlich gegenüber Zytostatikabehandlung = keine Amplifikation des MDR-Gens) wurde über mehrere Wochen mit stufenweise steigenden Konzentrationen von Adriamycin behandelt. Im Laufe der Behandlung erwarben die Zellen eine Resistenz gegenüber dieser Behandlung. Wirken gegenüber nichtresistenten Zellen 20 ng/ml Adriamycin bei einer Behandlungszeit von 4 Tagen stark toxisch, so sind die Zellen nach Langzeitbehandlung mit stufenweise steigenden Konzentrationen gegenüber 20 ng/ml Adriamycin völlig unempfindlich geworden (Figuren 8 und 9). Die Resistenzbildung beruht auf der Amplifikation des MDR-Gens. Nachgewiesen wird dies mit Hilfe der Northern-Technik, eines Verfahrens zum Nachweis von RNA-Molekülen, also der Transkription eines Gens, unter Einsatz des MDR-Gens als Sonde (Figur 10). Resistente Zellen zeigen eine Bande, nichtresistente Zellen (Zustand am Beginn der Behandlung) zeigen keine Bande.

25

30

In Parallelversuchen wird Adriamycin mit entweder 0,5 oder 1  $\mu$ g/ml BVDU zusammen gegeben (BVDU wirkt in menschlichen Tumorzellen erst ab etwa 10  $\mu$ g/ml toxisch, in Zellen der Maus ab etwa 8  $\mu$ g/ml (Figuren 8 und 9). BVDU verhindert die Resistenzbildung gegenüber Adriamycin. Die Tumorzellen bleiben empfindlich gegenüber der Zytostatikabehandlung und sterben ab. Die Wirkung des BVDU ist so stark, daß die Behandlung

35

durch Ruhepausen (Wachstum ohne Substanzen) unterbrochen werden muß, sich der Versuch also über 6 bis 8 Wochen erstreckt.

5 BVDU + Adiamycin-Behandlung führt zu einer wesentlich schwächeren Amplifikation des MDR-Gens als Adiamycin-Behandlung allein (Figur 10). Der Effekt der BVDU-Behandlung ist in Wirklichkeit noch sehr viel größer, als die Abschwächung der Bande ausdrückt. Am Ende der Behandlung bleiben nämlich nur Zellen übrig, die wenigstens eine gewisse Resistenz gegenüber der Adiamycin-Behandlung erworben haben. Die infolge der BVDU-Behandlung nichtresistent gebliebenen Zellen sind bereits vorher abgestorben. Der eigentlich relevante und mit Hilfe der Northern-Technik nicht faßbare Effekt besteht deshalb im Absterben der nichtresistenten Zellen, welche in den Inaktivierungskurven (Figuren 8 und 9) gemessen wird.

20 Da die Resistenzbildung gegenüber Zytostatikabehandlung in menschlichen Tumoren ebenfalls auf der Amplifikation des MDR-Gens beruht, ist durch die Kombination von BVDU mit einem beliebigen Zytostatikum die Möglichkeit geboten, die Therapie in niedrigen Dosen und über längere Zeiträume als bisher durchzuführen. Im übrigen ist die Verhinderung der Resistenzbildung auch für andere Anwendungen von großer Bedeutung.

25 D. Verhinderung der Bildung von "Multi-Drug-Resistance" (MDR) in Tumorzellen gegenüber Zytostatikabehandlung durch gleichzeitige Gabe von anti-rekombinogenen 5'substituierten Nukleosiden

30 In den Figuren 11 und 12 ist zu sehen, daß die anti-rekombinogene Wirkung nicht nur spezifisch für BVDU

gilt, sondern eine Eigenschaft aller 5'-substituierten Nukleoside ist.

5 Fig. 11 zeigt dabei die anti-rekombinogenen Effekte von (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin, (E)-5-(2-bromovinyl)-1- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-uracil und (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxy-4'-thiouridin in *Saccharomyces cerevisiae* MP1, und

10 Fig. 12 die anti-rekombinogenen Effekte von 5-Jodo-2'-deoxycytidin, 5-Jodo-2'-deoxyuridin und 2'-Deoxy-5-trifluoromethyluridin in *Saccharomyces cerevisiae* MP1.

15 20 Die Tumorzelllinie F4-6-WT der Maus (WT = Wildtyp = empfindlich gegenüber Zytostatikabehandlung = keine Amplifikation des MDR-Gens) wurde über mehrere Wochen mit stufenweise steigenden Konzentrationen von Adriamycin behandelt. Im Laufe der Behandlung erwarben die Zellen eine Resistenz gegenüber dieser Behandlung. Wirken gegenüber nichtresistenten Zellen 20 ng/ml Adriamycin bei einer Behandlungszeit von 4 Tagen stark toxisch, so sind die Zellen nach Langzeitbehandlung mit stufenweise steigenden Konzentrationen gegenüber 20 ng/ml Adriamycin völlig unempfindlich geworden (Figur 13 und 14). Die Resistenzbildung beruht auf der Amplifikation des MDR-Gens. Nachgewiesen wurde dies mit Hilfe der Northern-Technik, eines Verfahrens zum Nachweis von RNA-Molekülen, also der Transkription eines Gens, unter Einsatz des MDR-Gens als Sonde (Figur 15). Resistente Zellen zeigen eine Bande, nichtresistente Zellen (Zustand am Beginn der Behandlung) zeigen keine Bande. Die Level von  $\beta$ -Actin mRNA wurden vergleichsweise ebenfalls analysiert.

$\beta$ -Actin wurde als interne Kontrolle für die RNA-Menge benutzt.

5 In Parallelversuchen wurde Adriamycin mit 1  $\mu$ g/ml je eines 5'-substituierten Nukleosids zusammen gegeben.  
Alle sechs 5'-substituierten Nukleoside verhindern die Resistenzbildung gegenüber Adriamycin. Die Tumorzellen bleiben empfindlich gegenüber der Zytostatikabehandlung und sterben ab. Die Wirkung der 5'-substituierten Nukleoside war so stark, daß die Behandlung durch Ruhepausen (Wachstum ohne Substanzen) unterbrochen werden mußte, sich der Versuch also über 6 bis 8 Wochen erstreckte.

10 15 Figur 15 zeigt die Northern Blot Analyse der RNA: Expression der MDR-Gene in der Tumorzelllinie F4-6-WT der Maus. Die Level von  $\beta$ -Actin mRNA wurden vergleichsweise ebenfalls analysiert.  $\beta$ -Actin wurde als interne Kontrolle für die RNA-Menge benutzt.

20 pos. Adriamycin-resistente F4-6-WT Zellen

neg. Adriamycin-empfindliche F4-6-WT Zellen

1 1  $\mu$ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin + Adriamycin

2 1  $\mu$ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl-1- $\beta$ -D-arabinofuransyl-uracil + Adriamycin

25 3 1  $\mu$ g/ml (e)-5-(2-bromovinyl-2'-deoxy-4'-thiouridin + Adriamycin

4 1  $\mu$ g/ml 5-Jodo-2'-deoxycytidin + Adriamycin

5 1  $\mu$ g/ml 5-Jodo-2'-deoxyuridin + Adriamycin

30 6 1 mg/ml 2'-Deoxy-5-trifluoromethyluridin + Adriamycin

7 1  $\mu$ g/ml (E)-5-(2-bromovinyl-)-2'-deoxyuridine (BVDU) + Adriamycin

5' -substituiertes Nukleosid + Adriamycin-Behandlung führt zu einer wesentlich schwächeren Amplifikation des MDR-Gens als Adriamycin-Behandlung allein (Figur 15). Der Effekt der Behandlung ist in Wirklichkeit noch sehr viel größer als es die Abschwächung der Bande ausdrückt. Am Ende der Behandlung bleiben nämlich nur Zellen übrig, die wenigstens eine gewisse Resistenz gegenüber der Adriamycin-Behandlung erworben haben. Die infolge der BVDU-Behandlung nichtresistent gebliebenen Zellen sind ja bereits vorher abgestorben. Der eigentlich relevante und mit Hilfe der Northern-Technik nicht faßbare Effekt besteht deshalb im Absterben der nichtresistenten Zellen, welcher in den Inaktivierungskurven (Figur 13 und 14) gemessen wurde.

**Patentansprüche**

5        1. Verwendung von 5'-substituierten Nukleosiden in Kombination mit mindestens einem Zytostatikum zur Herstellung eines Arzneimittels zur Verhinderung bzw. Reduzierung der Resistenzbildung bei der Zytostatikabehandlung.

10       2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridin (BVDU) und/oder seine Metaboliten verwendet werden.

15       3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Metabolit (E)-5-(2-Bromovinyl)-uracyl (BVU) verwendet wird.

20       4. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid (E)-5-(2-bromovinyl)-1- $\beta$ -D-arabinofuranosyluracil und/oder seine Metaboliten verwendet werden.

25       5. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxy-4'-thiouridin und/oder seine Metaboliten verwendet werden.

30       6. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid 5-Jodo-2'-deoxycytidin und/oder seine Metaboliten verwendet werden.

7. Verwendung nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid 5-Jo-  
do-2'-deoxyuridin und/oder seine Metaboliten  
verwendet werden.

5

8. Verwendung nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosid 2'-  
Deoxy-5-trifluoromethyluridin und/oder seine  
Metaboliten verwendet werden.

10

9. Arzneimittel, enthaltend 5'-substituierte Nu-  
kleoside, nach mindestens einem der Ansprüche 1  
bis 8, in einer Menge, aus der eine Konzen-  
tration von 0,02 µg/ml bis 10 µg/ml im Blut resul-  
tiert, mindestens ein Zytostatikum und übliche  
Träger- und Hilfsstoffe.

15

10. Arzneimittel nach Anspruch 9,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleoside in  
einer Menge enthalten sind, aus der eine Konzen-  
tration von 0,05 µg/ml bis 5 µg/ml im Blut re-  
sultiert.

20

11. Arzneimittel nach Anspruch 9 oder 10,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Zytostatika aus-  
gewählt sind aus Alkaloiden, Alkylantien, Anti-  
metaboliten, Antibiotika oder Cisplatin.

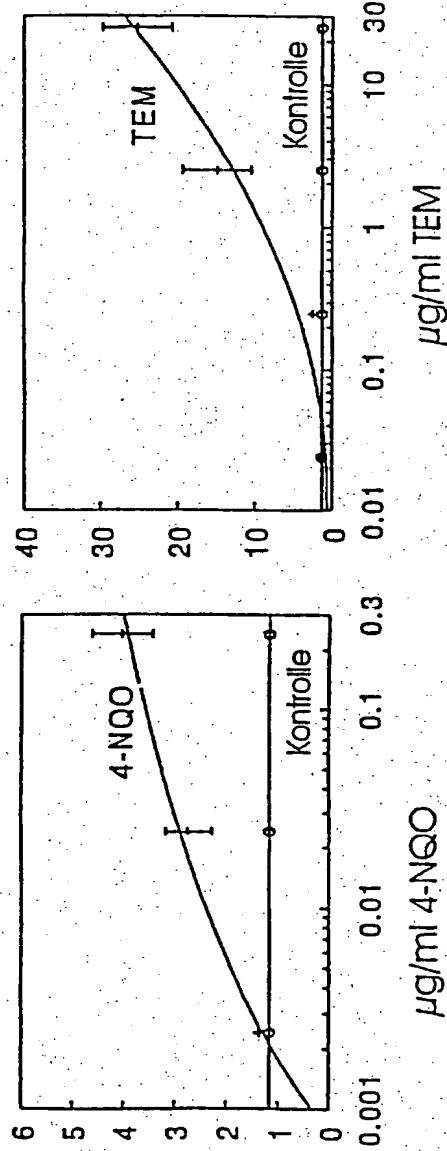
25

1/15

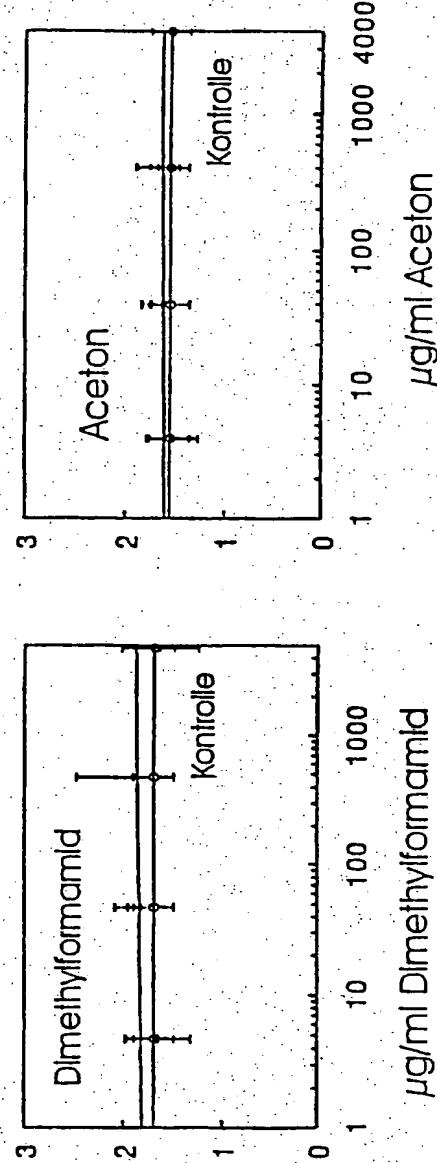
FIG. 1

DNA-Amplifikation in Zellen des Chinesischen Hamsters  
Positivkontrolle: Genotoxische Kanzerogene

## RELATIVER DNA-GEHALT



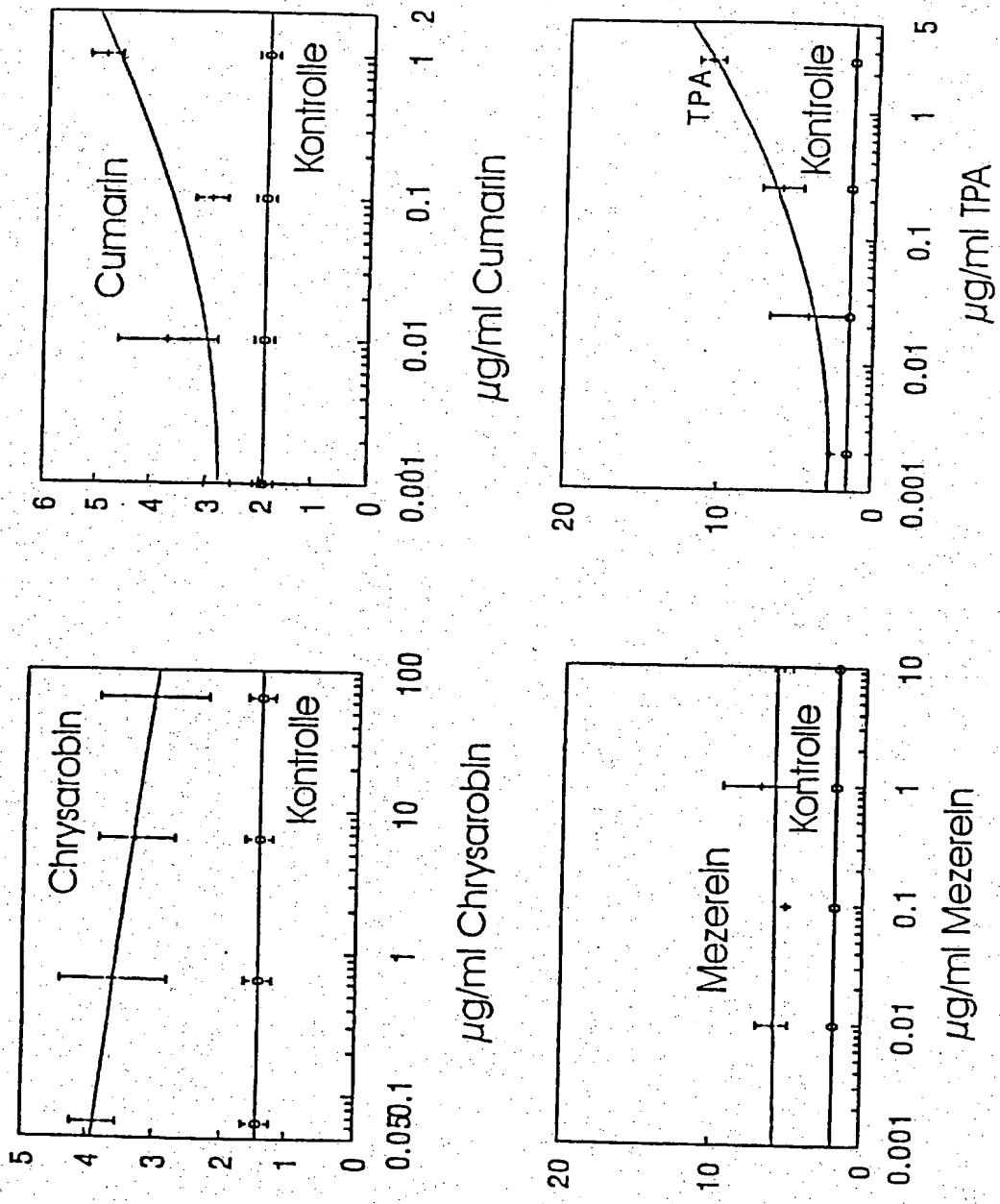
## Negativkontrolle: Nicht-Kanzerogene



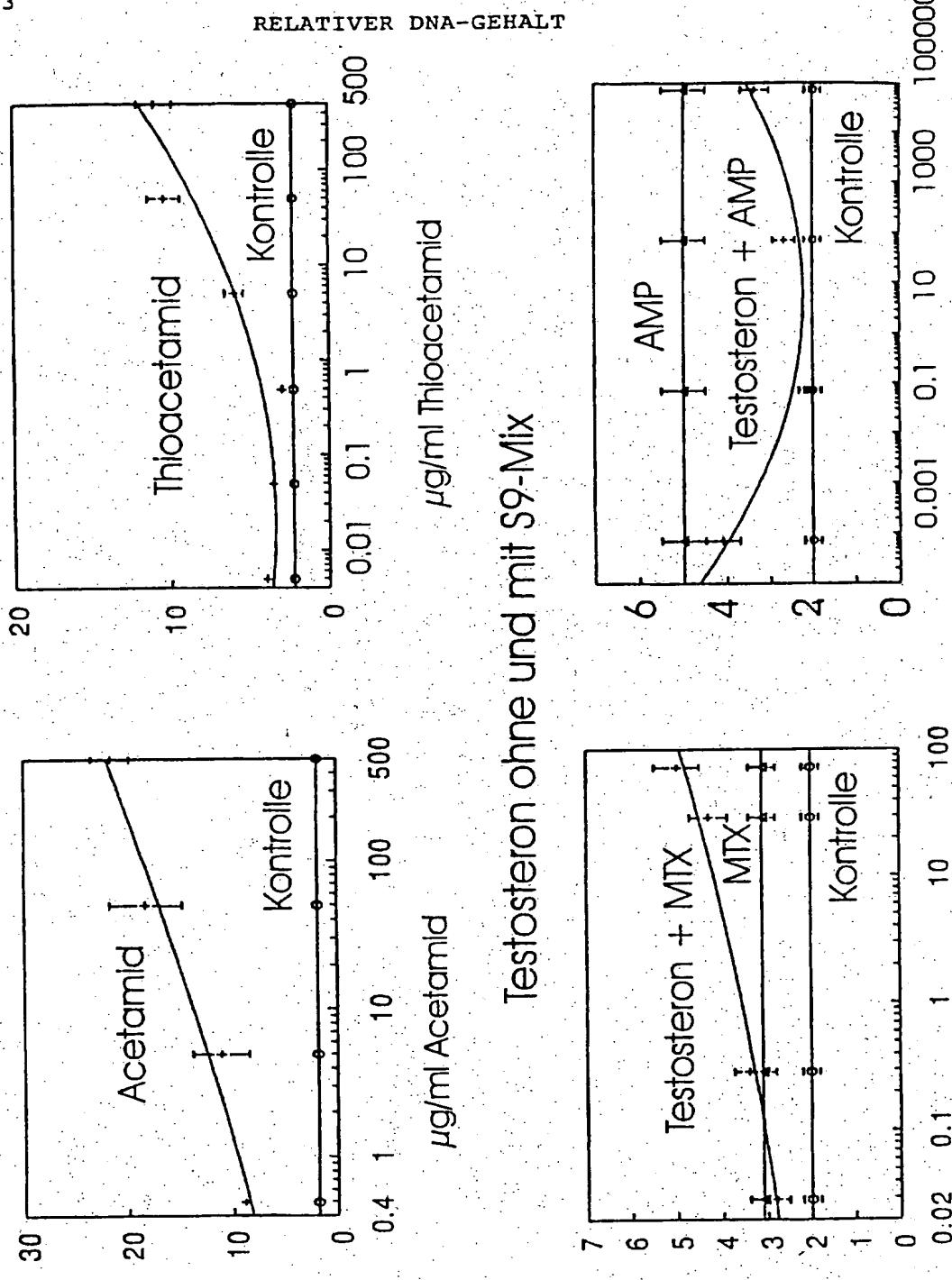
2/15

FIG. 2

## RELATIVER DNA-GEHALT

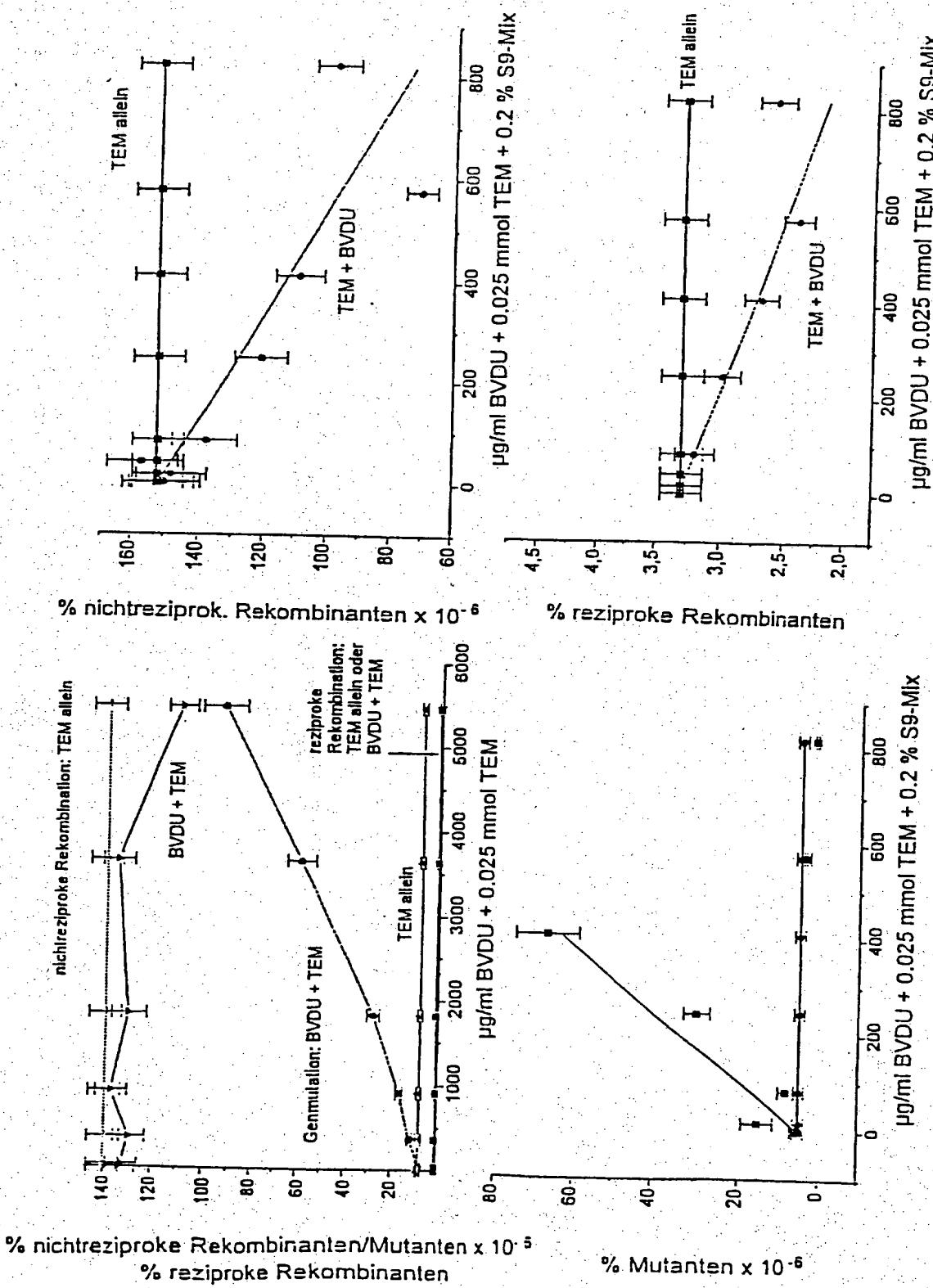
DNA-Amplifikation in Zellen des Chinesischen Hamsters  
Tumor Promotoren

# DNA-Amplifikation in Zellen des Chinesischen Hamsters Nicht-Genotoxische Kanzerogene



4/15

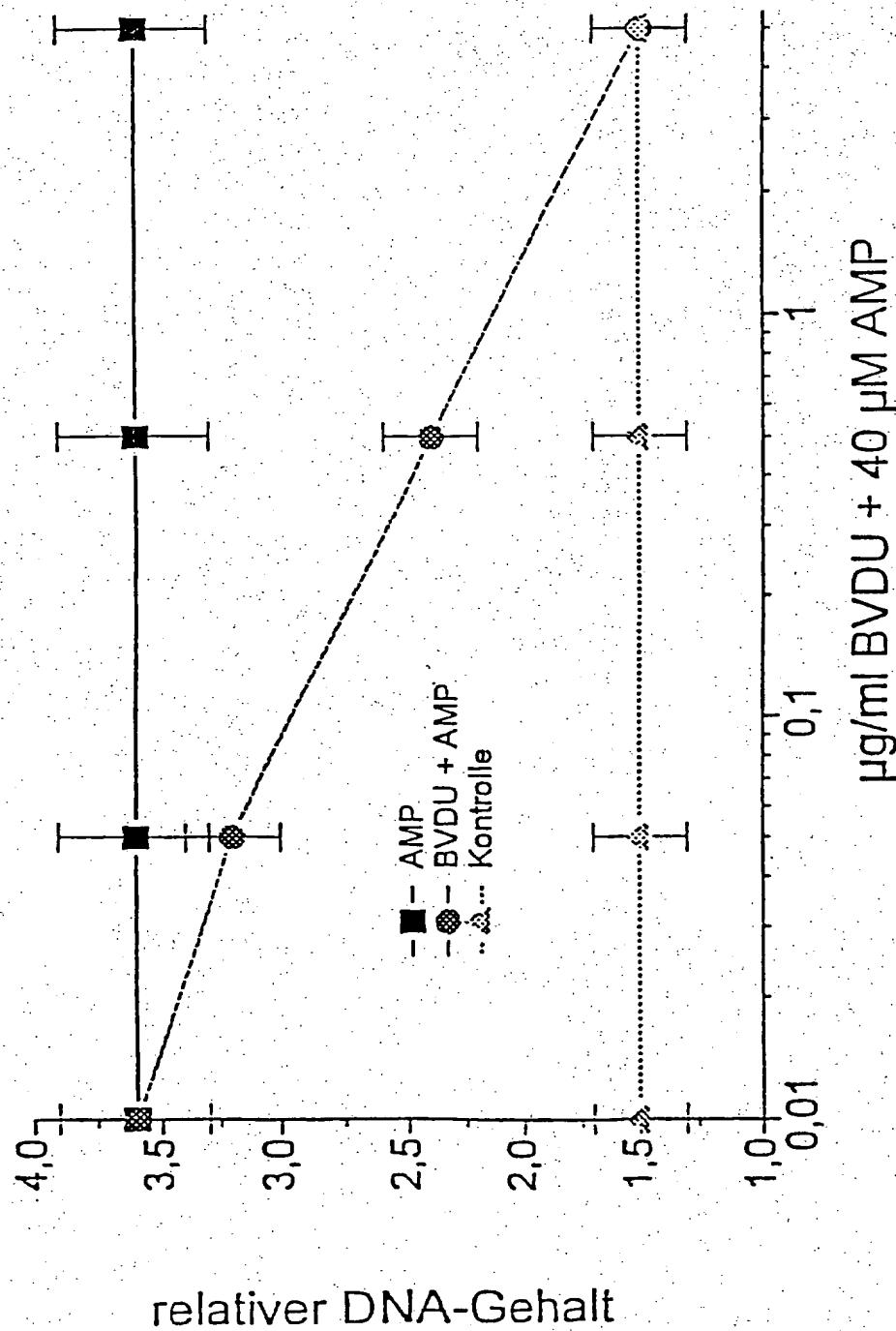
FIG. 4



ERSATZBLATT (REGEL 26)

5/15

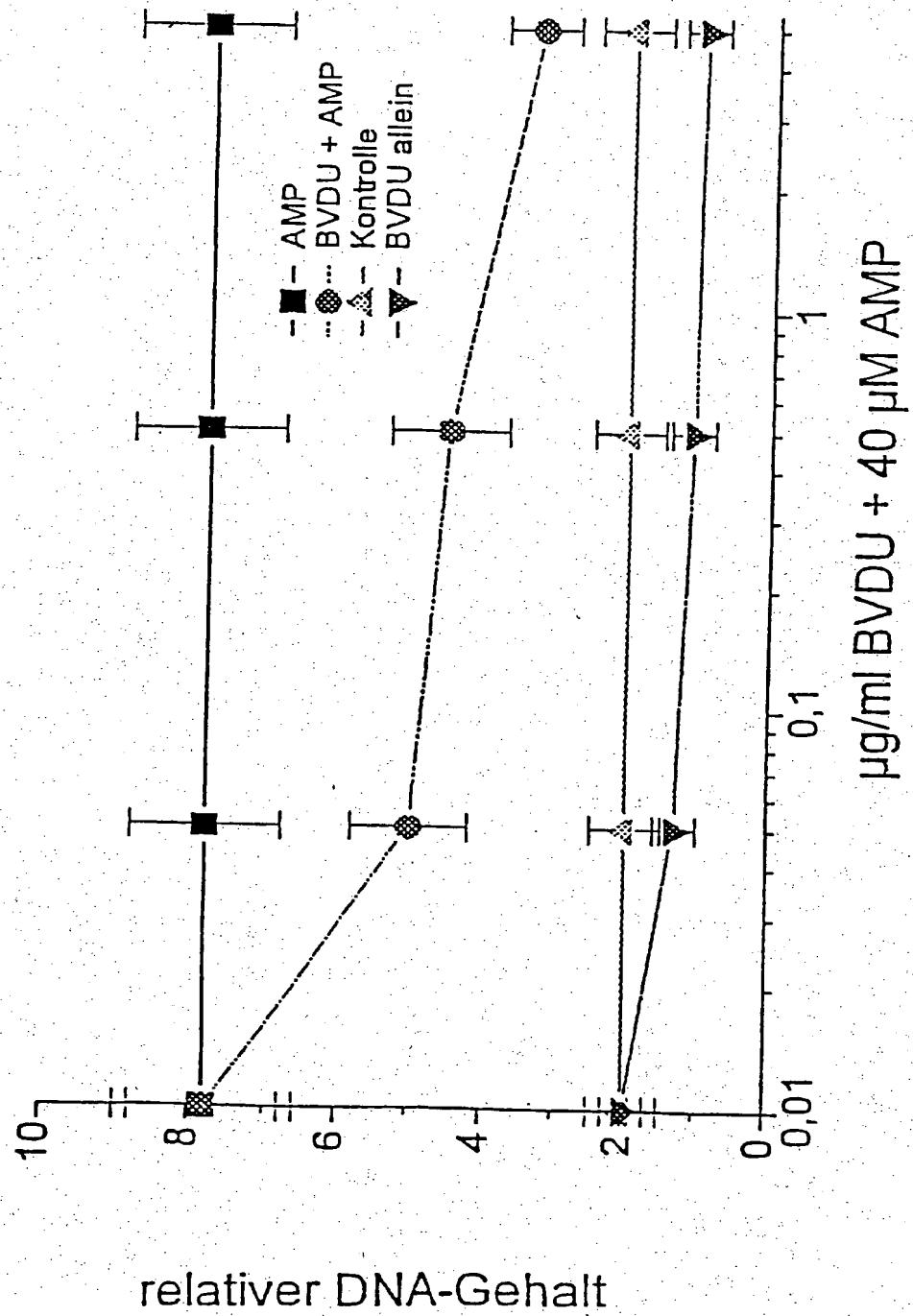
FIG. 5



ERSATZBLATT (REGEL 26)

6/15

FIG. 6



relativer DNA-Gehalt

ERSATZBLATT (REGEL 26)

7/15

FIG. 7

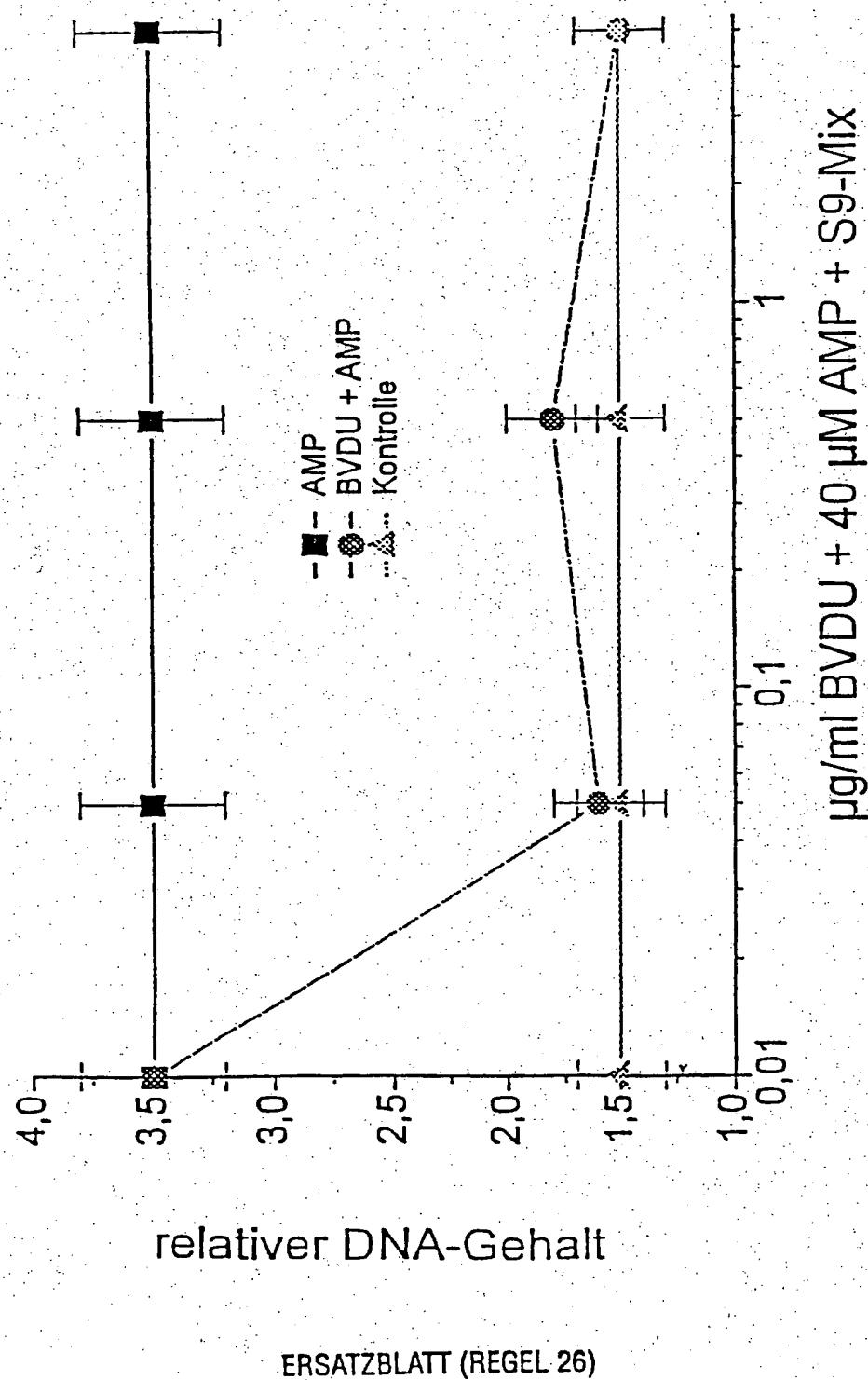
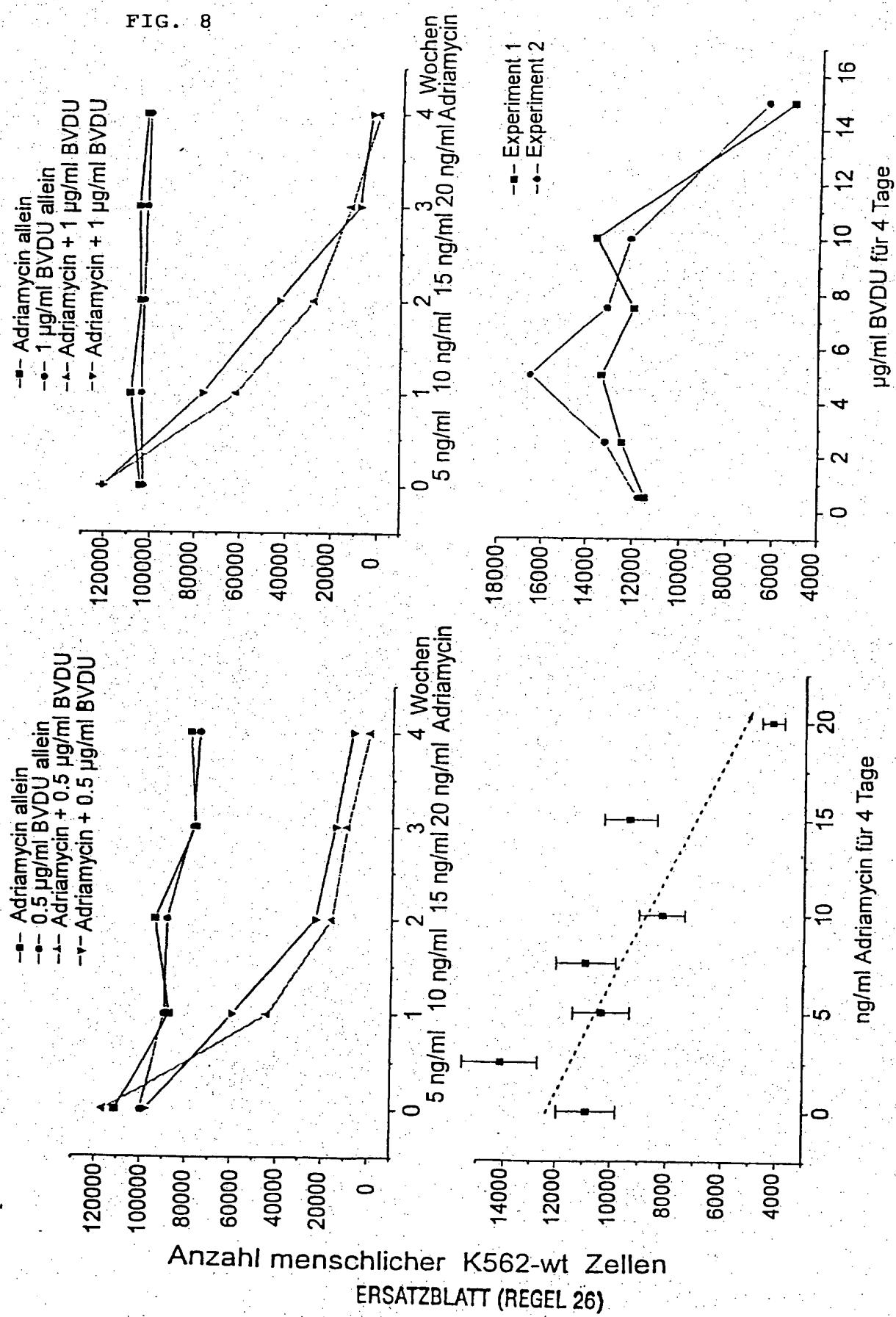
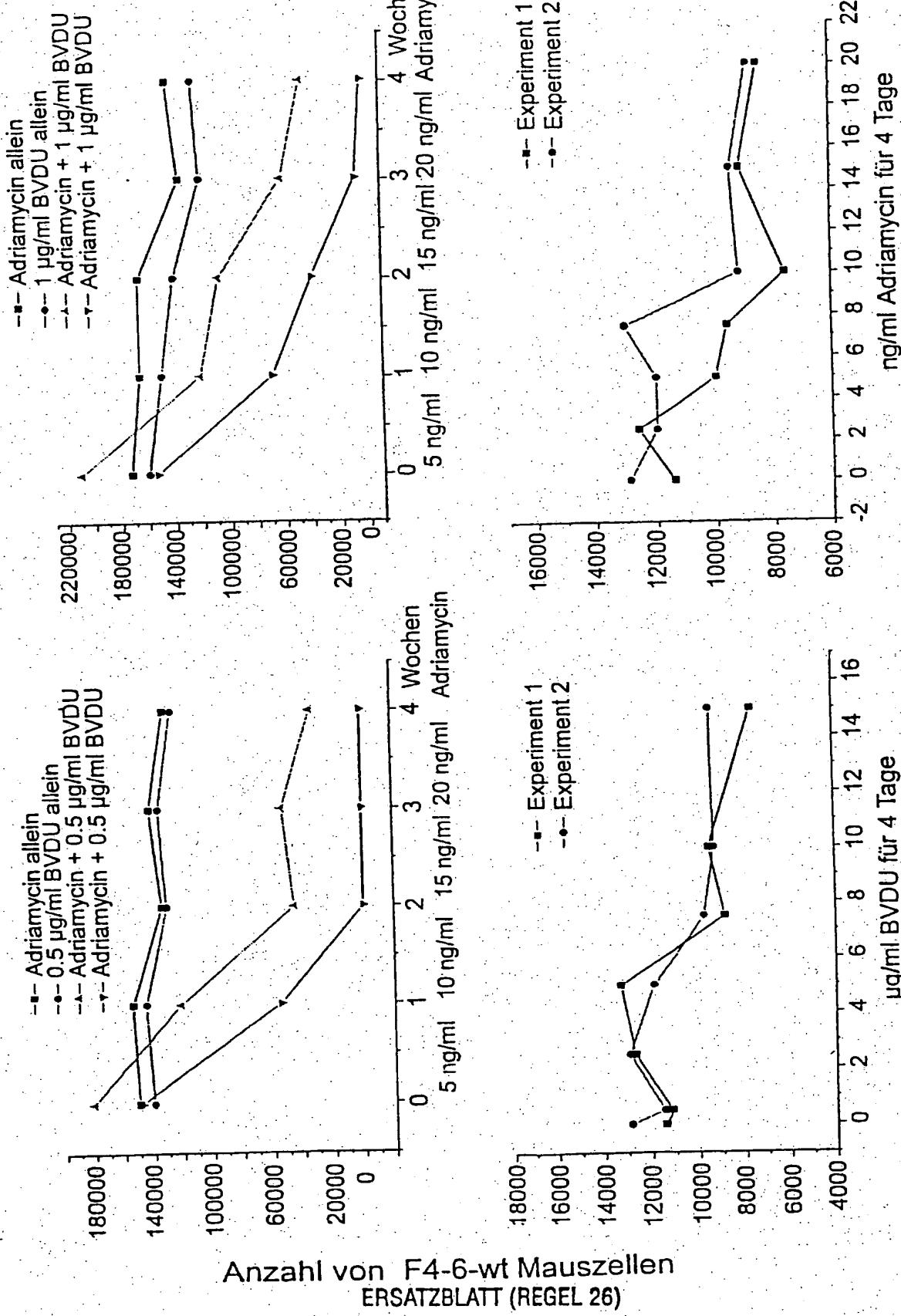


FIG. 8



9/15

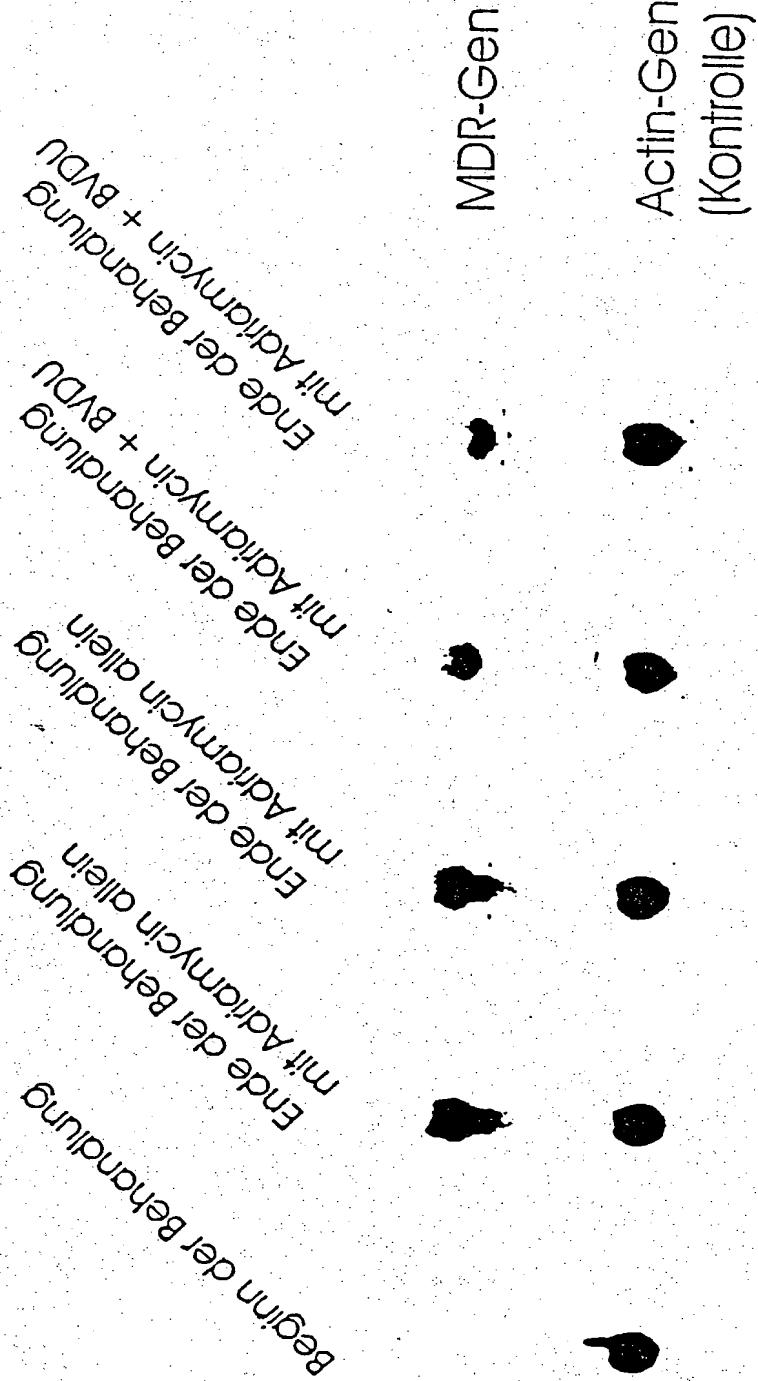
FIG. 9



Nachweis der Amplifikation des MDR-Gens in F46-WT-Zellen  
mit Hilfe der Northern-Technik - Als Sonde diente das MDR-Gen

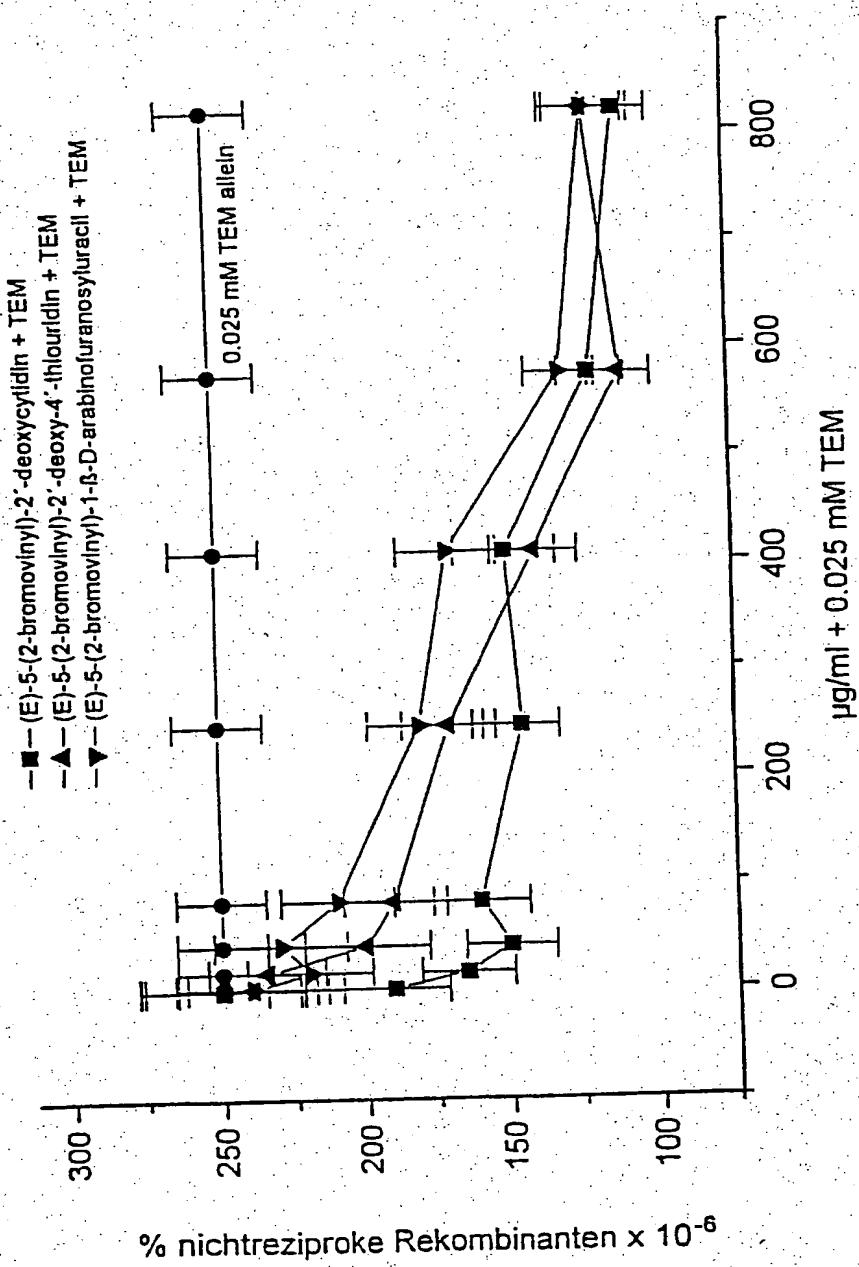
10/15

FIG: 10



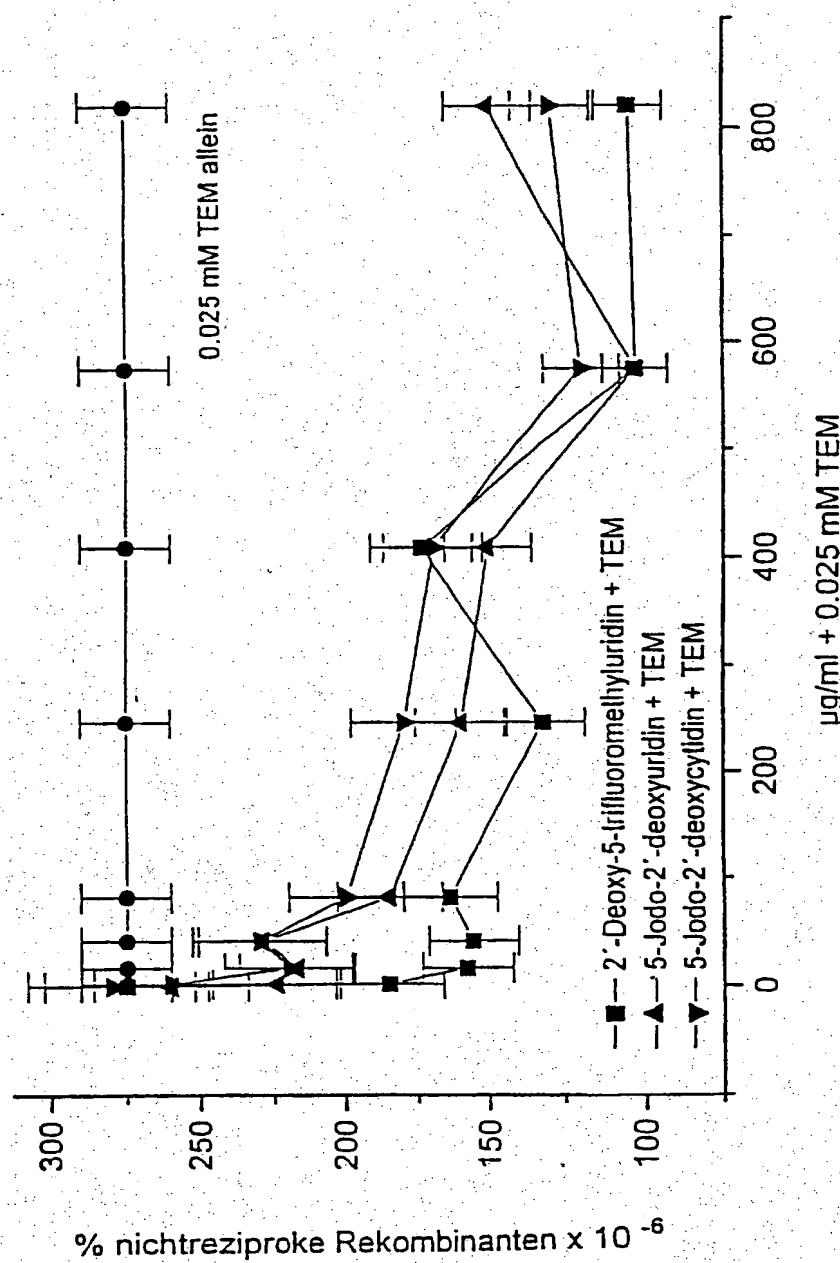
11/15

FIG. 11



12/15

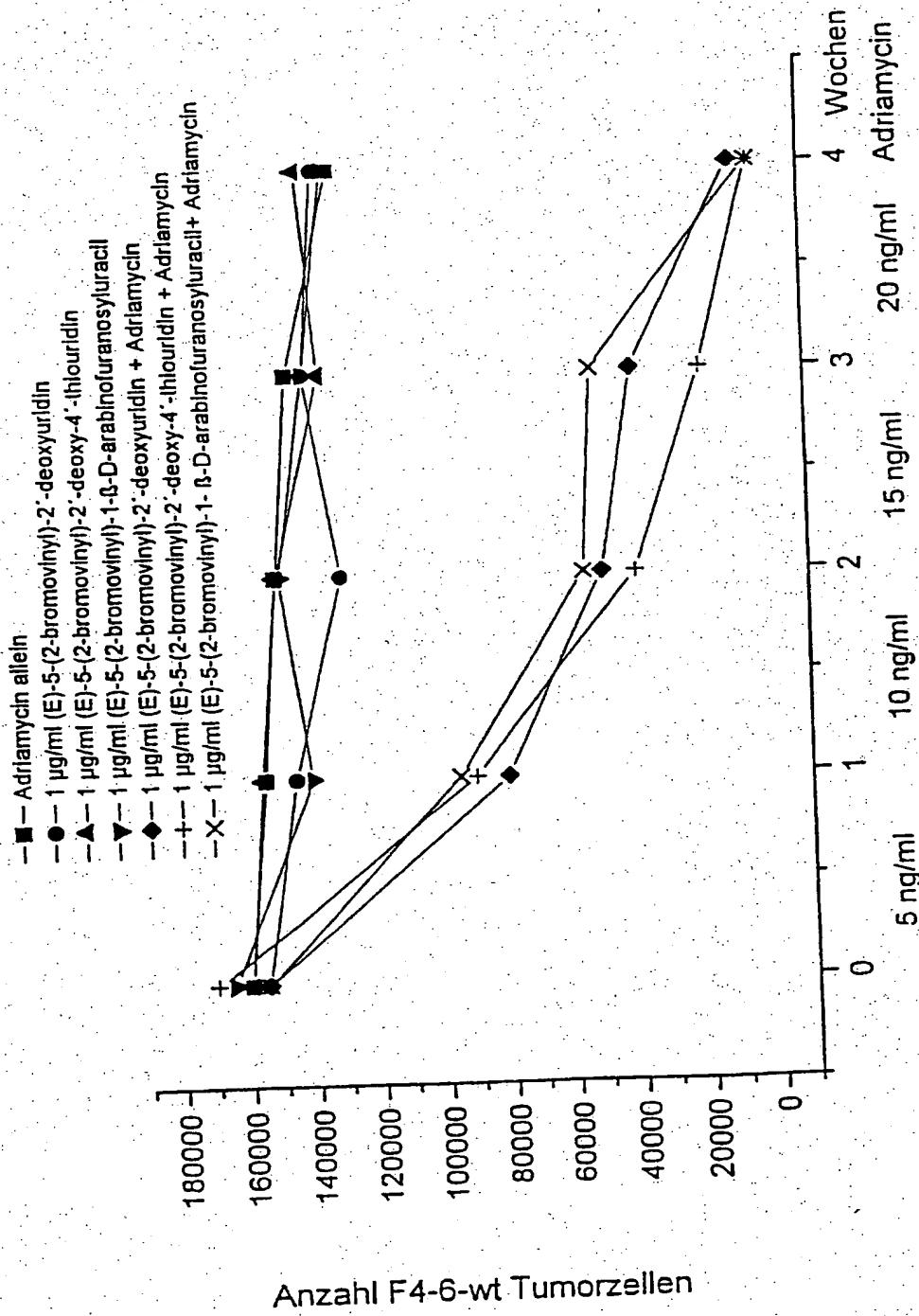
FIG. 12



ERSATZBLATT (REGEL 26)

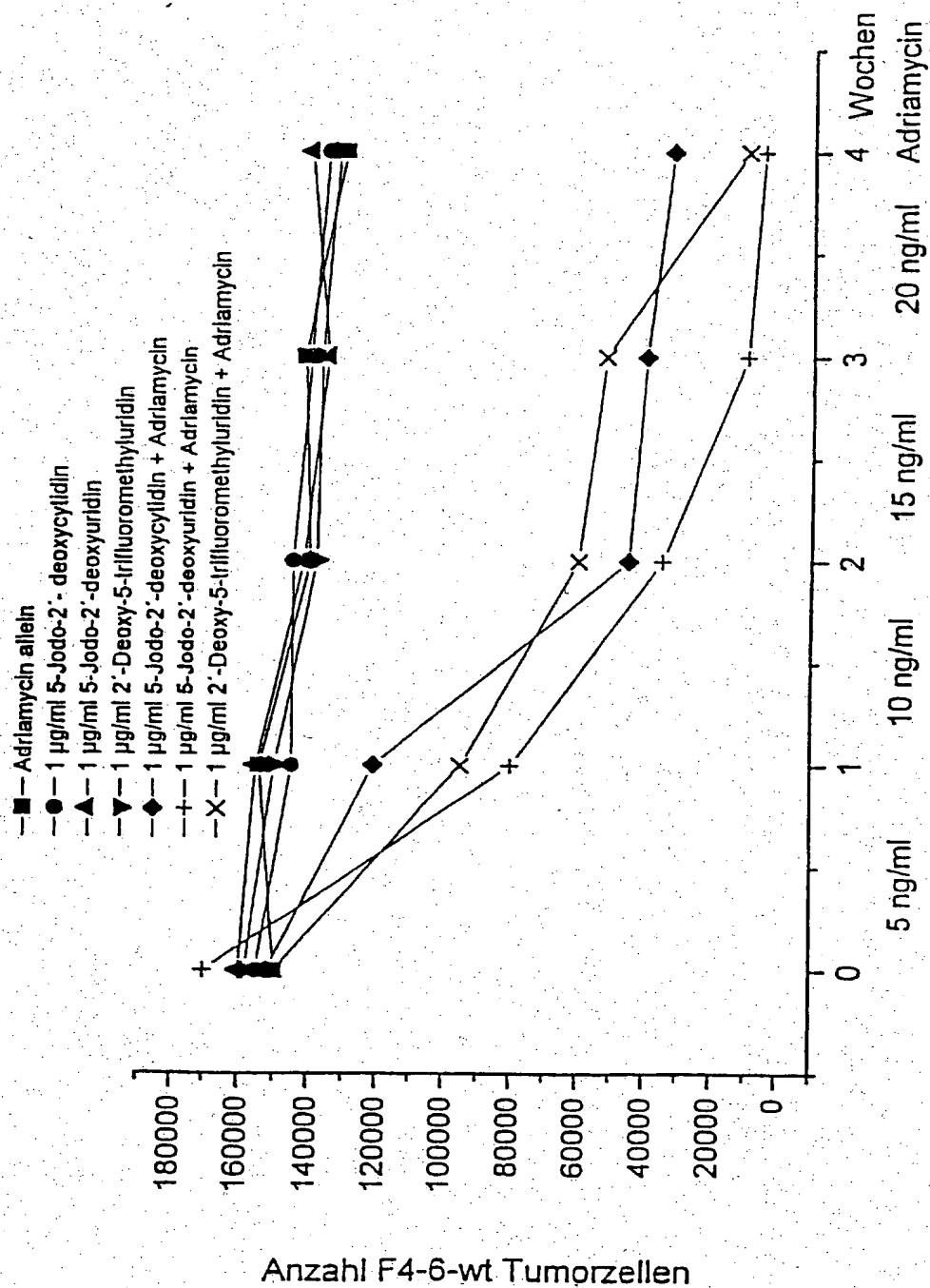
13/15

FIG. 13



14/15

FIG. 14



Anzahl F4-6-wt Tumorzellen

ERSATZBLATT (REGEL 26)

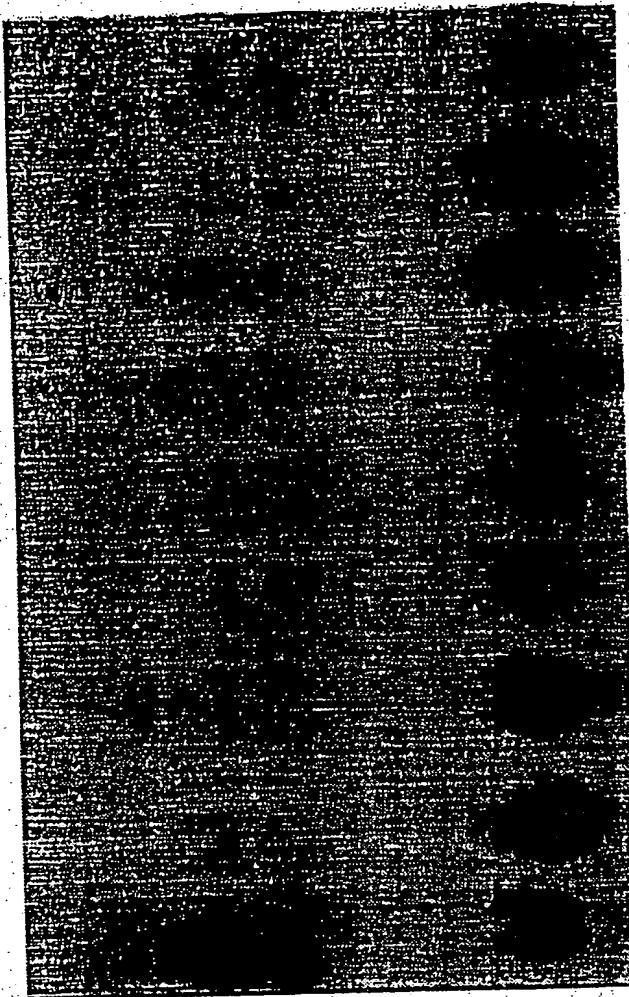
15/15

FIG. 15

pos. neg. 1 2 3 4 5 6 7

mcr

## B-Aktin



## ERSATZBLATT (REGEL 26)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 96/00169

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	INDIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY, vol. 22, no. 6, 1984, pages 333-334, XP000574699 CHAKRABARTY, MISHRA: "LOSS OF PLASMID LINKED DRUG RESISTANCE AFTER TREATMENT WITH IODO-DEOXYURIDINE" see page 334	1,7,11
X	TODAY'S LIFE SCIENCE, vol. 2, no. 9, 1990, pages 32-38 80, XP000575102 S. LOCARNINI: "HEPATITIS B ANTIVIRAL THERAPY" see page 37, left-hand column - page 38, middle column; table 1	1,2,11
A	see page 37, left-hand column - page 38, middle column; table 1	3-5,7,8

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 July 1996

Date of mailing of the international search report

15.07.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentstaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 631 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kanbier, D

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.:

PCT/DE96/00169

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 1-11 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  

In view of the large number of compounds which are defined by the wording of the claims, the search has been performed on the general idea and compounds mentioned in the examples of the description.
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of Invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/DE 96/00169

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 488 718 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 3 June 1992 see page 4; claims 1,6,8,13,15; example 6 ---	1,11
X	BE,A,640 236 (SODERSI) 16 March 1964 see page 4; claims 1-3,6,7 see page 10 ---	1,11
X	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER & CLINICAL ONCOLOGY, vol. 20, no. 4, 1984, pages 471-476, XP000575098 WILDIERS, DE CLERCQ: "ORAL (E)-5-(2-BROMOVINYL)-2'-DEOXYURIDINE TREATMENT OF SEVERE HERPES ZOSTER IN CANCER PATIENTS" see page 472, right-hand column; table 2 ---	1,2,11
A	CANCER RESEARCH, vol. 54, no. 10, 1994, pages 2701-2706, XP000574738 CHI, KUNUGI, KINSELLA: "IODODEOXYURIDINE CHEMOSENSITIZATION OF CIS-DIAMMINEDICHLOROPLATINUM(II) IN HUMAN BLADDER CANCER CELLS" see page 2705, right-hand column see page 2701-2 ---	9,10
X	J. CELL. PHARMACOL., vol. 1, no. 1, 1990, pages 2-7, XP000575045 WROBLEWSKI, HACKER: "THE POSSIBLE ROLE OF ALTERED NUCLEOTIDE METABOLISM IN CISPLATIN RESISTANCE" see page 6, left-hand column ---	1,7,11
A	GB,A,1 473 148 (RESEARCH CORPORATION) 11 May 1977 see page 1, right-hand column - page 2, left-hand column; claim 1 -----	1,11

## NATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Total Application No

PCT/DE 96/00169

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0488718	03-06-92	AT-T- 132756 DE-D- 69116321 DE-T- 69116321 JP-A- 5078256 US-A- 5250296	15-01-96 22-02-96 23-05-96 30-03-93 05-10-93
BE-A-640236	16-03-64	FR-A- 1567001 FR-M- 2824	16-05-69
GB-A-1473148	11-05-77	NONE	

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 A61K31/70

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	INDIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY, Bd. 22, Nr. 6, 1984, Seiten 333-334, XP000574699 CHAKRABARTY, MISHRA: "LOSS OF PLASMID LINKED DRUG RESISTANCE AFTER TREATMENT WITH IODO-DEOXYURIDINE" siehe Seite 334 ---	1,7,11
X	TODAY'S LIFE SCIENCE, Bd. 2, Nr. 9, 1990, Seiten 32-38 80, XP000575102 S. LOCARNINI: "HEPATITIS B ANTIVIRAL THERAPY" siehe Seite 37, linke Spalte - Seite 38, mittlere Spalte; Tabelle 1 ---	1,2,11
A	---	3-5,7,8 -/-

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist.

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Aussicht oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*&amp;\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Anmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

5.Juli 1996

15.07.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Kanbier, D

## INTERNATIONA

## R RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/00169

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 488 718 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 3.Juni 1992 siehe Seite 4; Ansprüche 1,6,8,13,15; Beispiel 6 ---	1,11
X	BE,A,640 236 (SODERSI) 16.März 1964 siehe Seite 4; Ansprüche 1-3,6,7 siehe Seite 10 ---	1,11
X	EUROPEAN JOURNAL OF CANCER & CLINICAL ONCOLOGY, Bd. 20, Nr. 4, 1984, Seiten 471-476, XP000575098 WILDIERS, DE CLERCQ: "ORAL (E)-5-(2-BROMOVINYL)-2'-DEOXYURIDINE TREATMENT OF SEVERE HERPES ZOSTER IN CANCER PATIENTS" siehe Seite 472, rechte Spalte; Tabelle 2 ---	1,2,11
A	CANCER RESEARCH, Bd. 54, Nr. 10, 1994, Seiten 2701-2706, XP000574738 CHI, KUNUGI, KINSELLA: "IODODEOXYURIDINE CHEMOSENSITIZATION OF CIS-DIAMMINEDICHLOROPLATIN(II) IN HUMAN BLADDER CANCER CELLS" siehe Seite 2705, rechte Spalte siehe Seite 2701-2 ---	9,10
A	J. CELL. PHARMACOL., Bd. 1, Nr. 1, 1990, Seiten 2-7, XP000575045 WROBLEWSKI, HACKER: "THE POSSIBLE ROEL OF ALTERED NUCLEOTIDE METABOLISM IN CISPLATIN RESISTANCE" siehe Seite 6, linke Spalte ---	1,7,11
A	GB,A,1 473 148 (RESEARCH CORPORATION) 11.Mai 1977 siehe Seite 1, rechte Spalte - Seite 2, linke Spalte; Anspruch 1 -----	1,11

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt I auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_ weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2.  Ansprüche Nr. 1-11 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  

In view of the large number of compounds which are defined by the wording of the claims, the search has been performed on the general idea and compounds mentioned in the examples of the description.
  
3.  Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_ weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
  
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_.
  
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung, diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt.

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

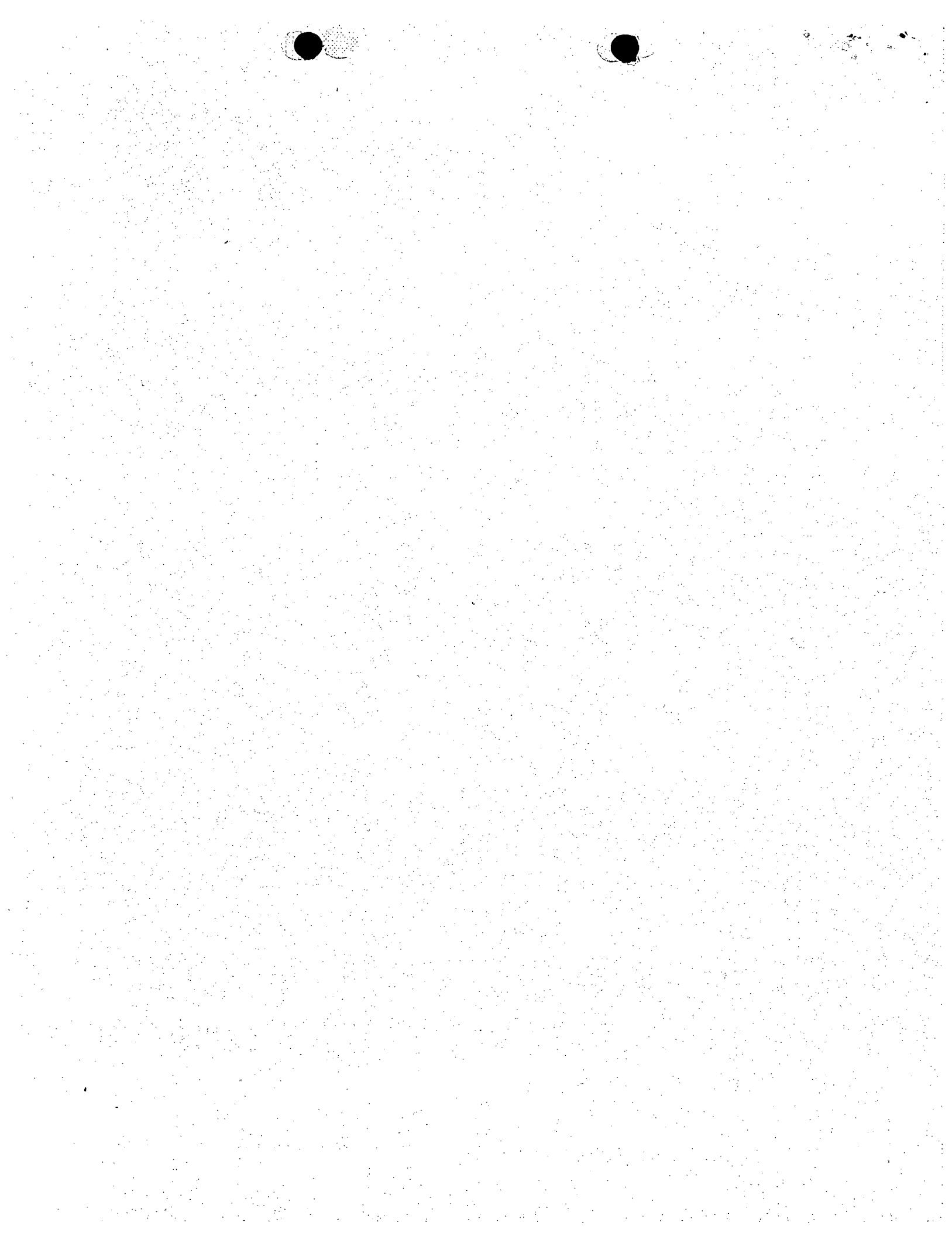
## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/DE 96/00169

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0488718	03-06-92	AT-T- 132756 DE-D- 69116321 DE-T- 69116321 JP-A- 5078256 US-A- 5250296	15-01-96 22-02-96 23-05-96 30-03-93 05-10-93
BE-A-640236	16-03-64	FR-A- 1567001 FR-M- 2824	16-05-69
GB-A-1473148	11-05-77	KEINE	



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**  
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)